

論文内容の要旨

論文提出者氏名 水谷 信介

論文題目

Loss of Runx1/AML1 arginine-methylation impairs in peripheral T cell homeostasis.

論文内容の要旨

ヒト白血病関連遺伝子変異において高頻度にその標的となる RUNX1(AML1)遺伝子は造血初期発生、血小板産生、T細胞分化などの重要な役割を担う転写因子をコードする。近年 RUNX1 はリン酸化、アセチル化、メチル化といった翻訳後修飾を受けることが明らかにされた。例えば種を超えて高度に保存されている runt domain の下流にあるアルギニン残基がメチル化を受けることが最近報告されており、このメチル化によってコリプレッサーとの会合が阻害され、結果的に RUNX1 の転写活性を上昇させることが *in vitro* での実験によって示されている。しかしながら、こうしたメチル化修飾がもつ生物学的意義については明らかにされていない。今回我々はこのような背景のもと、RUNX1 の翻訳後メチル化修飾の生物影響を明らかにすることを目的に、マウス ES 細胞を用いた一連の遺伝子標的実験を行った。

まずメチル化を受ける runt domain 下流の 2 箇所のアルギニン残基 (R206, R210) を、リシン残基へと置換すべく、2 箇所のミスセンス変異を導入した変異 Runx1 (KTAMK) の cDNA を作製した。この変異 cDNA を発現ベクターに挿入し、細胞株に導入して、M-CSF 受容体遺伝子プロモータに対する転写活性への影響をルシフェラーゼアッセイにより検討したところ、予想通り、野生型と比較してその活性が低下することが観察された。次にこの変異 Runx1 をノックイン法を用いて Runx1 欠損マウス ES 細胞に導入した。相同組み換え体では、変異 Runx1 が固有の転写制御下に発現されることになるが、これらの細胞は、野生型 Runx1 をノックインさせた場合と同様に、Runx1 欠損による造血障害がレスキューされ、試験管内での血球分化能を取り戻した。すなわち、*in vitro* において転写活性には影響を与えるものの、少なくとも血球初期発生制御作用において、アルギニン・メチル化修飾は必須とはならないことが示唆された。

in vitro での結果を個体レベルで検証すべく、引き続いて変異 Runx1 (KTAMK) ホモ接合マウスの作製へと検討を進めた。定法によって野生型 ES 細胞の Runx1 遺伝子座に変異 Runx1 (KTAMK) を導入し、キメラマウス作製を経て胚細胞系列マウスを 2 系統樹立した。このマウスでは変異アリルからは野生型の Runx1 は産生されず、変異 Runx1 (KTAMK) のみが産生される。野生型 Runx1 の cDNA をノックインさせたマウスは正常に成育することが報告されているが、同様に変異 Runx1 (KTAMK) ホモ接合体マウスは正常に生誕し、その遺伝子型はおおよそメンデル則にしたがって分離することを認めた。また成体の造血組織に顕著な異常を呈さず、健康に生育し、交配可能であった。すなわち Runx1 欠損によ

る致死性造血障害は、アルギニンメチル化修飾を欠く変異 Runx1 (KTAMK) 分子の発現によってレスキューすることが可能であること、つまり個体の造血発生・維持には Runx1 のアルギニンメチル化修飾を介する転写活性作用は必須ではないことが明らかになった。

そして成体のホモ接合マウスを野生型同胞と比較したところ、末梢血血球数に差はないものの、ホモ接合マウスにおいてリンパ球分画の減少と好中球分画の増加傾向を伴うことを見出した。また胸腺、脾臓、骨髓等の造血関連組織に関して肉眼的に、また組織学的構築に著変は認めなかったものの、末梢リンパ組織である脾臓において CD3 陽性また CD4 陽性 T 細胞分画の減少と、その結果 CD4/8 比の減少を認めた。骨髓系細胞に関しては著変を認めなかった。これらの結果から、末梢血リンパ球減少傾向は CD4 陽性 T 細胞の減少に起因するものと考えられ、Runx1 のアルギニンメチル化領域は血小板産生能には必須とならないものの、T細胞分化に重要な働きをしていることが示された。

以上の結果から、Runx1 の runt-domain 直下の 2 か所のアルギニン残基のメチル化は、転写活性化能に影響を与えるものの、その造血初期発生制御作用には必須としないことを *in vitro/in vivo* 双方のアプローチによって明らかにした。一方、これらのアルギニンメチル化修飾は末梢 CD4 陽性 T リンパ球の維持という Runx1 によるリンパ系での生物作用に影響を及ぼしていることが示された。Runx1 翻訳語修飾とその生物作用における役割は、正常造血あるいは造血器腫瘍発生のメカニズムの解明に寄与し、また分子標的治療を開発する上で大いに貢献するものと考えられ、この遺伝子改変マウスの詳細な表現型解析によって、今後、Runx1 による造血・免疫細胞制御メカニズムの詳細や白血病発症の分子基盤を明らかにしてゆく上で大いに貢献するものと考ええる。